



とする、前掲1~6項の一つに係る製法。

9) 反応末期の懸液から遠心分離によりバクテリアを分離することを特徴とする、前掲1~8項の一つに係る製法。

10) Yeast carbon base Difco 1.17g、アセトニトリル0.1g、グロース2.5gを含む培地に培がら、選定したバクテリアを使用することを特徴とする、前掲1~8項および9項の一つに係る製法。

#### 本発明の詳細な説明

本発明は、対応するニトリルの生物学的な加水分解による有機酸類の製造法に関する。

たとえば乳酸やアミノ酸類のような、断片的に製造された有機酸類の製造については、対応するニトリルの化学的加水分解により製造することがすでに提案されている。しかし、この方法は、とくにつぎの理由から、必ずしも常に適用できない。すなわち、ニトリルのうちには化学的加水分解に応じないものがあり、この場合、この作用を奨励するためには迂回した方法による必要があり、た

より望ましくは、モントペリエの国立農薬高等学校の遺伝学講座のコレクションに保管番号R332、R340、R341、A111、B222、A112、A13、A141、A142、B211、B212、B221、C211、R21、R22、R311、R312、R331で保管されている、第1表および第2表に記載の形態学的、生理学的特徴を示す菌株の中から選ぶ。

ニトリル溶液は、バクテリアと反応させる前に、たとえば苛性ソーダまたはアンモニアにより調節して弱い塩基性のpHにするといふ。

本発明の方法においては、培地で培養後のニトリル活性を有する菌株をニトリル水溶液中に懸浮させ、これらの菌株により数時間で上記溶液の加水分解が表現される。溶液のpHは弱い塩基性（たとえば、pH8）または中性に保持するが、加水分解を完全なものにするためには、約1時間後に溶液のpHを弱い酸性にすることが、しばしば、必要となる。

加水分解が完了すると、すなわち、概して数時間後、生化学的方法で既知のあらゆる手段で、

特開昭 3586 の

たとえば、α-アミノ酸類の場合、ニダントインを測ることが考えられるが、この方法は有効であっても、プロセス上懸念がかかる。その他の場合は、化学的加水分解の生成物は、反応培地の他成分からの分離が困難である。

本発明は、これよりやすい化合物を取扱う場合にとくに好ましい材料や条件の下で、実用上すべてのニトリル類の加水分解を可能にする方法を提示するものであり、この方法自体が奨励きわめて容易で、かつ、生取された限の反応培地からの分離を容易に行なうことができる。

本発明の方法においては、対応するニトリルを、水溶液で、ニトリル活性 (activité nitrilase rigide) 示すバクテリアと反応させ、つぎにバクテリアを懸液液から分離することによつて、上記ニトリルから有機酸が得られる。本発明の方法で用いられるニトリル活性を有するバクテリアは、*Bacillus* 類、*Prevot* の属での *Bacteroides* 類、*Micrococcus* 類、*Dorger* の属での *Brevibacterium* 類の中から選ぶのが好ましい。

たとえば遠心分離で、バクテリアを除去する。一方、彼は既知の方法で、たとえば抽出、沈降などにより溶液から抽出する。

本発明の好ましい実施法によれば、土、水または工業廃棄物のような各種の細菌源により、バクテリアに注入した、Yeast carbon base Difco 1.17g、アセトニトリル0.1g、グロース2.5gを含む培地に接種することによつてニトリル活性を有するバクテリアの菌株を選択する。形成されるコロニーを分離し、ついで培養物を希釈し同一培地上に塗布して淨化する。こうして得られたコロニーを研究する。

選択した菌株は、たとえばグルコース化した Yeast nitrogen base Difco のような、炭水化物、アンモニア、ビタミン、グルコースを含む培地に保存することができる。

前記のプロセスにより選択した菌株のニトリル活性はきわめて一般的である。すなわち、本明細書に記載した菌株は次のような化合物をほぼ一般に加水分解することができる。

- アセトニトリルのような単純なニトリル類
- ユーアミノプロピオニトリル、ユーアミノニアルテオプロニトリル、ユーアミノプロニトリル、アミノアセトニトリルのようなユーアミノニトリル類
- ラクトニトリル、ヒドロキシアセトニトリルのようなヒドロキシルニトリル類
- アミノ-3-プロピオニトリルのようなアミノニトリル類
- マロニトリルのようなジニトリル類
- アクリロニトリルのような不飽和ニトリル類
- ホモペラトリンニトリルのようなホモベンゼンニトリル類

前記の毒物プロセスにより、出題人は18の毒物を分類したが、これらの毒物は出題人の方法を要する上でとくに好ましいニトリル特性を有し、つぎの共通した特徴を有する。

- グラム陽性、耐アルコール・酸性性
- 呼吸性きびしい、カタラーゼ陽性

- 特開 3586 (D)
- ガスを生成せず、かつ炭性化することなく炭化によるグルコース、マツコロース、マルトース、ラクトースの発酵可能。どの菌もアルコールを生成しない。でん粉は加水分解しないが、じやがいもで炭化。
  - じやがいもによるコロニーで炭性性。
  - ビタミン要求あり。
  - セラチンの加水分解なし。
  - アンモニアおよび唯一の窒素源としての酪素で炭化。
  - 炭化水素の発酵なし。
  - 塩分過多な塩の存在下での炭化なし。
- 全菌株が菌液による培養基中でアンモニアを産じるほか、B221、B211、B212、C211を例外、菌液培養をせざる。B222菌液は菌液からガスを発生する。
- C211、B312、B222、A111、B341、B340、B332が下記番号の下に Central Bureau for Whistled-culture (オランダ) に保管される。

表1 炭 炭 炭 炭 炭		炭 炭 炭 炭 炭		炭 炭 炭 炭 炭	
炭 炭	炭 炭	炭 炭	炭 炭	炭 炭	炭 炭
B332	+	炭 炭	炭 炭	炭 炭	炭 炭
B340	+	炭 炭	炭 炭	炭 炭	炭 炭
B341	+	炭 炭	炭 炭	炭 炭	炭 炭
A111	-	炭 炭	炭 炭	炭 炭	炭 炭
B222	-	炭 炭	炭 炭	炭 炭	炭 炭
A112	-	炭 炭	炭 炭	炭 炭	炭 炭
A13	-	炭 炭	炭 炭	炭 炭	炭 炭

A141	-	炭 炭	炭 炭	炭 炭	炭 炭
A142	-	炭 炭	炭 炭	炭 炭	炭 炭
B211	-	炭 炭	炭 炭	炭 炭	炭 炭
B212	-	炭 炭	炭 炭	炭 炭	炭 炭
B221	-	炭 炭	炭 炭	炭 炭	炭 炭
C211	-	炭 炭	炭 炭	炭 炭	炭 炭
B21	-	炭 炭	炭 炭	炭 炭	炭 炭
B22	-	炭 炭	炭 炭	炭 炭	炭 炭

0-53586 (7)

C211:CB8

0222:CBQ

**A 1 1 1 : C 3 8**

२३५१ : ०३२

**2340:038**

**В 332 : С В Д**

場合によりたえば、ホスホータリオン（トリル）エトリルの不溶性が強いことが問題となるが、不明の方法に使用されるパラタリウムのエトリル  
 不溶性はさほど高くない。

当法を有するバクテリアをリタイタルさせること  
 が可能であり、このためわが国産半導体的に作製  
 し、つぎの反応の時給に必要を消費カとアンモ  
 ニアの消費量を減らすこととが出来ることである。

以下、本発明の方法の工會的応用例を若干示し、  
実施の形態を明らかにするが、本発明は何れにと  
りによつて限定されない。

すなわち、不発明による意味は、とくに炭素を含む培養基としてヘキサデカンまたは「ガス油」を使用（これはガス油の脱パラフィン (deparaffinized) を可能にする）するか、または完全な無菌液として脱脂乳を使用することにより経コストの増大で培養することができる。

本邦明の刀匠のこれらの発見物はすべて、セントペテリスの国立農畜高等学校の通訳学調査のコレクシオン並びに保管倉庫OBG717-73でGodtman Bureau voor Schiedel cultureel (オランダ)に保管されているR312番帳を使用して整理したものであり、選定した電報の非等強性を証明することと主として目的としている。これ

は、実施例は全篇 R312 菌株を用いたが、ほとんど全菌の遺伝型が以下に記述する加水分解を表現することが出来るからである。

#### 実施例 1

##### ラセミ体乳酸の製造

R312 菌株を、炭素源としてグルコースを含む培地で培養した。成長後、細胞を遠心分離し、Physiologic Water で水洗してから、化学的合成で得られたラクチドニトリルの 10 重量百分溶液より調製した反応培地に懸濁させた。可溶性またはアンモニアで pH を調整した。と当たり約 20~40g の乾燥物であるバクテリア細胞がかく持下 25℃で 2~3 時間でニトリルの完全な加水分解を行なった。ここでバクテリア細胞を遠心分離により除去した。脱脂に持上つたものは、乾燥により重量的収率で回収可能な乳酸アンモニウムを含む。この生成物はここまですり利用可能である。それから、その用途は多く、たとえば、肥料における石灰質剤として利用できる。また、既知のあらゆる方法で乳酸を回収することも可能であり、たと

うしてから、グリシノニトリル（塩化水素の形）の 6% 水溶液で調製した反応培地に懸濁させた。培地の pH は可溶性またはアンモニアで付添に調整した。

と当たり 60~80g の乾燥物であるバクテリア細胞が 25℃で約 5 時間で pH を約 1 時間、pH を 7 でつぎの 4 時間ニトリルを完全に酸化する。

ここで細胞を遠心分離により除去し、ついで得られた遊離の量を 1/2 に減らし、メタノールを添加して知えてグリコロールを析出した。

#### 実施例 2

##### ラセミ体 α-アラミンの製造

R312 菌株を、炭素源としてグルコースを含む培地で培養した。成長後、細胞を遠心分離し、Physiologic Water で水洗してから、塩化 α-アミノプロピオニトリルの 5 重量百分溶液で調製した反応培地に懸濁させた。pH を 8 に調整し、2 時間この値に保持した。と当たり 20~40g の乾燥物であるバクテリア細胞がかく持下 25℃で 2~3 時間で反応の完全な加水分解を表現した。

たとえば、塩化カルシウム、ニチルニトリルまたはその他の適切な有機溶剤でもって定量的収率で遊離抽出が可能である。この乳酸は食品工業で利用される一方、化学または薬品工業で利用される。

#### 実施例 3

##### グリコロールの製造

この方法においては、シアン酸の水溶液とアセトアルデヒドの水溶液を前と同様条件でモル比モルで反応させることにより、炭酸でラクチドニトリルを分解した。培地の pH は、反応進行のため脱脂アンモニアを加えて 5 の付添に調整した。つぎに第 2 工程として、培地の pH をアンモニアにより 8 に調整し、バクテリア細胞を、と当たり乾燥重量 20~40g の割合で培地に懸濁させ、同記実施例と同様、2~3 時間で加水分解を表現した。

#### 実施例 4

##### グリコロールの製造

同記実施例と同じく、R312 菌株を、炭素源としてグルコースを含む培地で培養した。成長後、細胞を遠心分離し、Physiologic Water で水洗

し、遠心分離による細胞の除去後、培地はと当たり約 40g の α-アラミンを含み、これを既知の方法で回収した。

#### 実施例 5

##### β-アラミンの製造

R312 菌株を前と同様に培養し回収した。アミノ-3-プロピオニトリルの 5 重量百分溶液により調製した反応培地にこれを懸濁させ、pH を 8 に調整し、3 時間この値に保持した。つぎに pH を 7 にし、かく持下 25℃で 5 時間この値に保持した。と当たり 60~80g の乾燥物であるバクテリア細胞がこれらの条件の下で完全な加水分解を表現した。遠心分離による細胞の除去後、培地はと当たり 60g の β-アラミンを含み、これを既知の方法で回収した。

#### 実施例 6

##### ラセミ体メチオニン

R312 菌株を前と同様に培養し回収した。水中で 6 重量百分の α-アミノ-ノタルオプタロニトリルの 5 重量百分溶液で調製した反応培地に懸濁させ

させ、 $\text{OH}$ 基を脱離した。とりなり $\text{OH}$ 基の  
 反応物であるバクテリア細胞は $23^\circ\text{C}$ で  
 3時間ほど加水分解を完了した。加水分解による細胞  
 崩壊を、細胞の重さを1/3と減らし $\text{OH}$ とした。  
 メチオニンが析出された。収率は80%程度であった。

#### 実験例7

実験例2と同様式、直接反応割合 (Proportions  
 stoichiométrique) のメチルメチルプロピ  
 オンアルデヒド、アセトアルデヒド、アセトアルデヒド  
 物から $\text{C}_4$ -アミノ- $\text{C}_4$ -メチルメチルプロピ  
 ンを提得で製造することができた。反応が完了し  
 たとき、バクテリアを洗浄させ、実験例6と同様  
 に操作した。

シアン化合物の有毒性を考慮して、反応平衡につ  
 いて若干調整する必要がある。

加水分解されたメチルメチルシアン酸と平衡状態  
 に入る場合、一方で、反応した物質はすべての  
 場合ニトリルをわけて分離であり、また他方では、  
 加水分解反応により平衡が崩れ、溶液中に存  
 在するシアン化合物が析出し完全に利用される。

特開第30-3586号

ただし、あらゆる事故を防止するため生産中  
 のシアン化合物の濃度コントロールを絶えず監視  
 にする必要がある。同時にかかる正視監視割合不  
 足は常に可能である。

以上により、この反応は幾つか条件で簡単に  
 2反応地より多量のメチルメチルシアン酸を  
 得るため生産性化合物を絶えず監視するもつて  
 得ることを可能にする。

特許出願人 アジヤン・ナショナル・ド・  
 パリ・サシオン・ド・ラ・  
 カシエリヤ

代理人 秋元 昭

向 秋元 不二

#### 6. 特許以外の発明者および代理人

##### 発明者

住所 フランス国クレルモン・フェラン 34000  
 ヴィン・ナショナル  
 氏名 フラン・ブルノ  
 住所 フランス国クレルモン・フェラン 34000  
 アベニール・デ・ムン・レ・ムン・ラン(事務所)  
 氏名 ビエール・ブルノ  
 住所 フランス国クレルモン・フェラン 34000  
 クロ・デ・マイン・プロシ・アー(事務所)  
 氏名 ジヤン・クロード・ジャラビヤ

##### 代理人

住所 東京都千代田区丸の内3丁目4番2号  
 氏名 (1615) 外理士 秋元 不二

#### 手続補正書

昭和49年10月25日

特許庁長官 殿  
 (特許庁審査官 殿)

##### 1. 事件の表示

昭和49年特許第108882号

##### 2. 補正の名称

生物学的加水分解による有機炭素の製造法

##### 3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

氏名 (607) アジヤン・ナショナル・ド・パリ・サシオン・  
 ド・ラ・カシエリヤ

##### 4. 代理人

住所 東京都千代田区丸の内3丁目4番2号

電話 (211) 4501~3番

氏名 (622) 外理士 秋元 昭

住所 同上

氏名 (1615) 外理士 秋元 不二

##### 5. 補正命令の日付 (自明)

補正日 昭和 年 月 日

##### 6. 補正の対象 特許全文

##### 7. 補正の内容

特許のとり方 内容に改定し

特許法第17条の2の規定による補正の掲載  
昭和49年特許願第108288号(特開昭  
50-53586号 昭和50年9月12日  
発行公開特許公報50-536号掲載)につ  
いては特許法第17条の2の規定による補正があっ  
たので下記のとおり掲載する。

Int. Cl.	特許 記号	序内整理番号
C12P 7/56		6760 4B
13/06		6712 4B
13/12		6712 4B
C12R 1/07		
1/265		
1/13		

## 手続補正書

昭和56年7月30日

特許庁長官 殿

(特許庁審査官

殿)

### 1. 事件の表示

昭和49年特許願第108288号

### 2. 発明の名称

生物学的加水分解による有機酸の製造法

### 3. 補正をする者

事件との関係 出願人

氏名(名称) アソヤンヌ・ナショナル・ド・パロイザン・  
ド・ラ・ルンニエル

### 4. 代理人

住 所 東京都港区南青山一丁目1番1号

〒107 電話 475-1501(代)

氏 名 (6222) 弁護士 秋 元 輝 雄

住 所 同 所

氏 名 (1615) 弁護士 秋 元 不二三

### 5. 補正命令の日付(発見)

(発見日) 昭和 年 月 日

### 6. 補正の対象

明細書の特許請求の範囲

### 7. 補正の内容

別紙のとおり

### 特許請求の範囲

本願液状のトリルをニトリル活性を有するバ  
クテリアと反応させることを特徴とする、対応す  
るニトリルの加水分解による有機酸の製造法。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**